



Revisado por: _____

Data: _____

ELISA IgM para zika

Versão resumida do protocolo do CDC

Observação: consulte o protocolo completo EUA antes do teste para obter mais informações. Este documento é um guia do trabalho em laboratório.

1. Prepare a placa Immulon 2HB: marque a posição das amostras e dos controles. Use apenas os 60 poços internos.
2. Revista a placa com 75 μ L de IgM anti-humano por poço diluído a 1:2000 em tampão de revestimento, pH 9,6.
3. Cubra a placa e incube-a a 4 °C durante a noite (pelo menos 16 horas).
4. Remova o líquido da placa e seque-a com material absorvente.
5. Bloqueie os poços com 200 μ L de tampão de bloqueio por poço.
6. Cubra a placa e incube-a à temperatura ambiente por 30 minutos.
7. Enquanto isso, dilua o soro do paciente e o controle negativo a 1:400 em tampão de lavagem; dilua o controle positivo de acordo com sua titulação (sugestão de 1:3000 para o controle de flavivírus quimérico). Use líquido cefalorraquidiano (LCR) não diluído ou a um máximo de 1:5 em tampão de lavagem e inclua um controle de LCR negativo na placa.
8. Lave a placa 5 vezes com o tampão de lavagem usando uma lavadora de placas automática e 300 μ L por poço e por ciclo de lavagem.
9. Adicione 50 μ L de controles e soros diluídos do paciente aos poços apropriados da placa, 6 poços por amostra correspondendo a 3 réplicas em antígenos viral e normal. Certifique-se de que os poços não sequem antes da adição dos soros. O LCR deve ser testado em triplicata.
10. Cubra a placa e incube-a por 1 hora a 37 °C em uma câmara úmida (por exemplo, uma sacola plástica vedada contendo uma toalha de papel molhada).
11. Enquanto isso, dilua os antígenos normal e viral para zika em tampão de lavagem (sugestão de 1:160 para antígenos Vero E6 e 1:800 para antígenos COS-1).
12. Repita a lavagem no ponto 8.
13. Adicione 50 μ L de antígeno viral a 3 poços por amostra e 50 μ L de antígeno normal a 3 poços por amostra e controle.
14. Incube durante a noite a 4 °C em câmara úmida.
15. Repita a lavagem no ponto 8.
16. Dilua o conjugado de detecção (peroxidase de rábano silvestre 6B6C-1) em tampão de bloqueio (sugestão de 1:4000 para conjugados comerciais).
17. Adicione 50 μ L de conjugado diluído por poço a todos os poços.

18. Incube a placa coberta por 1 hora a 37 °C em câmara úmida.
19. Enquanto isso, remova a garrafa de substrato TMB do refrigerador e deixe-a em temperatura ambiente.
20. Lave a placa 10 vezes, girando a placa na lavadora na metade do ciclo.
21. Adicione 75 µL de substrato TMB por poço. Coloque a placa em um local escuro e incube-a à temperatura ambiente por 10 minutos.
22. Adicione 50 µL de solução de parada por poço a todos os poços, incluindo os poços externos, e leia a placa após 1 minuto a 450 nm.
23. Calcule os resultados da seguinte forma:
(P) DO do controle positivo com reação ao antígeno do zika
(N) DO do controle negativo com reação ao antígeno do zika

Se o P/N resultante do soro de controle positivo for ≥ 2 , o teste será válido. Se ele for < 2 , o teste deverá ser repetido.

A fórmula a seguir é aplicada aos soros do paciente:

(P) DO da amostra do paciente com reação ao antígeno do zika
(N) DO do controle negativo com reação ao antígeno do zika

Os resultados da amostra de um paciente com um valor de P/N $\geq 3,0$ são considerados como suspeita de positivo.

Os resultados da amostra de um paciente com um valor de P/N $\geq 2,0$, mas $< 3,0$ são considerados como duvidosos.

Os resultados da amostra de um paciente com um valor de P/N $< 2,0$ são considerados como negativos.

Todos os resultados positivos ou duvidosos deverão ser verificados em reação ao antígeno normal, de acordo com a seguinte fórmula:

DO da amostra do paciente com reação ao antígeno do zika
DO da amostra do paciente com reação ao antígeno normal

Se o resultado for < 2 , isso indicará reação de fundo e o resultado desse paciente não poderá ser interpretado.

Nos casos em que a amostra do paciente é negativa E ela foi obtida < 9 dias após o início dos sintomas, uma amostra convalescente deverá ser obtida, já que a amostra pode ter sido obtida antes do desenvolvimento de anticorpos.

Materiais e reagentes

Tampão de revestimento:

Tampão de carbonato/bicarbonato, pH 9,6
1,59 g de Na₂CO₃ + 2,93 g de NaHCO₃ diluído em 1 L de água.

Tampão de lavagem:

Fosfato salino tamponado (PBS), 0,05% Tween 20, pH 7,2.
O PBS está disponível em pó de várias fontes comerciais.

Tampão de bloqueio:

PBS/5% leite/ 0,5% Tween 20

Solução de parada:

1 N H₂SO₄

Anticorpo de revestimento:

IgM anti-humano (cabra)
Kirkegaard and Perry Laboratories cat. n° 01-10-03

Antígeno viral:

Antígeno de cultura de tecido com radiação gama, não infeccioso, previamente titulado (CDC) ou antígeno COS-1, não infeccioso (CDC).

Antígeno normal:

Antígeno de cultura de tecido de animais não infectados (mock-infected) (CDC) ou antígeno COS-1, não infeccioso (CDC).

Deteção de anticorpo conjugado:

Anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase de rábano silvestre 6B6C-1 (disponível comercialmente na InBios International ou Hennessy Research. O conjugado de anticorpo de deteção da Hennessy Research deve ser usado apenas com antígenos Vero E6.)

Substrato:

3, 3', 5' base tetrametilbenzidina (substrato Enhanced K-Blue TMB), Neogen Corp., catálogo n° 30817

Placas:

Placas Immulon II HB de fundo chato de 96 poços
Dynatech Technologies, catálogo n° 3455

Lavadora de microplacas

Leitor de microplacas

Incubadora

Pipetadores de canal único e multicanal

Reservatórios de reagente

Sacos Ziploc, papel toalha